



# Study on the Mode of Action of Antitumor Macrolide Aplyronine A

著者	平山 裕一郎
その他のタイトル	抗腫瘍活性物質アプリロニンAの作用機序に関する研究
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2013
報告番号	12102甲第6807号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00122301">http://hdl.handle.net/2241/00122301</a>

氏 名（本 籍 地）	平山裕一郎（熊本県）
学 位 の 種 類	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	博 甲 第6807号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科
学 位 論 文 題 目	Study on the Mode of Action of Antitumor Macrolide Aplyronine A (抗腫瘍活性物質アプリロニン A の作用機序に関する研究)

  

主	査	筑波大学教授	理学博士 木越英夫
副	査	筑波大学教授	理学博士 関口 章
副	査	筑波大学教授	Ph.D. 山本泰彦
副	査	筑波大学教授	理学博士 市川淳士

## 論 文 の 要 旨

アプリロニン A (ApA,) は海洋軟体動物アメフラシ *Aplysia kurodai* から単離されたマクロリドであり、非常に強力な細胞毒性と抗腫瘍活性を示す。また ApA はアクチンと 1:1 で結合し、重合したアクチンの脱重合を引き起こす。しかし ApA の細胞毒性は他のアクチン脱重合活性物質と比較しても著しく強く、また DNA や微小管、細胞周期調節酵素群などの既存の抗がん剤の標的に対するアッセイでは活性を示さないことからその抗腫瘍活性の作用機序に興味が持たれていた。

構造活性相関研究や X 線結晶構造解析から ApA は側鎖部でアクチンと結合するが、一方でアクチンとの結合に関与しないマクロラクトン環上の官能基が細胞毒性に重要であることが報告されていた。例えば 7 位トリメチルセリン基を持たない類縁体アプリロニン C (ApC) は、ApA と同等のアクチン脱重合活性を有するが、細胞毒性は ApA よりも 1000 倍以上弱い。従って ApA はマクロラクトン環上の官能基で、アクチン以外の第二の標的タンパク質と相互作用することで、顕著な活性を発現していると推測された。そこで本研究では ApA をリガンドとしたビオチンプローブを合成し、第二の標的タンパク質の同定を行った。

ApA の側鎖部末端に PEG リンカーを介してビオチン基を導入した ApA-bio を合成した。ApA-bio は細胞毒性とアクチン脱重合活性を示し、ApA の活性を良好に保持していた。そこで ApA-bio を用いて HeLa S3 細胞の抽出液から標的タンパク質を精製したところ、アクチン以外に二つのタンパク質が得られ、これらを Arp2 と Arp3 (Actin Related Protein 2, 3) と同定した。Arp2 と Arp3 はアクチン骨格の維持に重要な Arp2/3 複合体を形成するタンパク質である。Arp2,3 の ApA への結合様式の詳細や ApA の強力な細胞毒性への関わりは不明であったため、共有結合を形成できる光親和性プローブを用いてより詳細な解析を行った。

光親和性プローブとしてジアジリン基を導入した ApA-PB を合成し、ApA-PB を HeLa S3 細胞の抽出液に加え、光反応を行った。その後、NeutrAvidin 樹脂で光標識されたタンパク質を精製した。得られたタン

パク質を銀染色で検出すると、ApA-bio を用いた時と同様にアクチンに加えて Arp2 と Arp3 が検出された。しかし HRP 標識 Streptavidin を用いた Western Blotting (WB) ではアクチンのみが検出されたため、ApA-PB はアクチンとは直接結合するが、Arp2, 3 とは直接相互作用していないと考えられた。さらにネガティブコントロールであるアプリロニン C 光親和性プローブ ApC-PB を用いても ApA-PB と同様に Arp2 と Arp3 が精製されたため、Arp2, 3 は ApA の強力な細胞毒性に重要な、目的の第二標的タンパク質ではないと考えられた。

細胞抽出液から目的の標的タンパク質の精製が上手くいかない原因として標的タンパク質が不安定であり、細胞からの抽出過程で変性していることが考えられた。そこで細胞内での標的タンパク質の光ラベル化実験を試みた。ApA-PB を生細胞に投与して細胞内で光反応を行い、抽出したタンパク質を NeutrAvidin 樹脂で精製後、HRP 標識 Streptavidin を用いて標識化されたタンパク質を検出した。この結果、アクチン以外に 55 kDa と 58 kDa にビオチン標識されたタンパク質のバンドを検出した。これらの標識化は過剰のアプリロニン A により競合阻害されたため、これらのタンパク質は ApA-PB と特異的に結合していると示唆された。ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 解析によって二つのバンドには主に  $\alpha$ -および  $\beta$ -チューブリンが含まれていることが明らかとなった。また  $\beta$ -チューブリン抗体を用いた WB から、ApA-PB の存在下では  $\beta$ -チューブリン (55 kDa) の精製量が顕著に増加していることが分かった。これらの知見より、新たに精製された ApA の新規標的タンパク質をチューブリンと同定した。

細胞内で ApA がチューブリンと作用していることが確認されたため、次に in vitro で精製チューブリンに対する ApA やアクチンの結合様式について詳細な解析を行った。ApA-PB 単独ではチューブリンを標識化できなかったが、アクチンを共存させるとアクチンだけでなくチューブリンも標識化されることが確認された。また ApC-PB ではアクチン共存下でもチューブリンの標識化は検出されなかった。これらの知見より ApA は ApA-アクチン複合体としてチューブリンと結合しており、その結合にはトリメチルセリン基が重要であることが強く示唆され、目的の標的タンパク質がチューブリンであると考えられた。

チューブリンの重合と脱重合による微小管のダイナミクスは細胞の有糸分裂や細胞内物質輸送などにおいて重要な働きをする。特に有糸分裂は細胞増殖に必須であり、これを阻害することで細胞の増殖を停止させ、異常となった細胞のアポトーシスを誘導する。従って有糸分裂に作用する微小管阻害薬は抗がん剤として広く一般に用いられている。そこでまず in vitro の系でのチューブリンの重合に対する ApA やアクチンの影響を調べた。ApA、アクチンはそれぞれ単独ではチューブリンの重合にほとんど影響しない。しかし、両者を 1:1 で混合すると濃度依存的にチューブリンの重合を阻害した。すなわち ApA-アクチン複合体がチューブリンに作用し、その重合を阻害していると考えられた。

さらに三元複合体の結合様式を解析するため、ApA とアクチンおよびチューブリンを混合してゲルろ過 HPLC 分析を行った。見出された三元複合体のピークを電気泳動と溶出時間から解析することで、三元複合体の分子量をおよそ 150 kDa と見積もり、その組成はアクチン-ApA 複合体 (43 kDa + 1 kDa) とチューブリンヘテロダイマー (100 kDa) の 1:1 であると推定した。

本研究により、ApA はアクチンと複合体を形成した後、さらにチューブリンヘテロダイマーと 1:1 で結合し、三元複合体を形成することで、チューブリンの重合を阻害することを見出した。すなわち ApA はこれまでに例がない、アクチンとチューブリン間のタンパク質間相互作用を誘導することで、微小管ダイナミクスを顕著に阻害する化合物であると推測される。ApA を HeLa S3 細胞に投与すると、細胞毒性を示す低濃

度で紡錘体の形成異常を引き起こし、アポトーシスを誘導することが共同研究者により明らかにされている。このことから、ApA が細胞内でも微小管に作用し、微小管ダイナミクスを阻害することで、顕著な抗腫瘍活性を発現していると考えられる。ApA は新しい作用機序をもつ微小管阻害剤であり、今後、研究ツールや医薬品のシードとして利用することで、生命科学や医療の発展に寄与できる可能性が期待される。

## 審 査 の 要 旨

### 〔批評〕

既存の抗がん剤を上回る抗腫瘍性を持つ海洋産マクロライドは、細胞骨格タンパク質に係ることは分かっていたが、それだけではその構想活性相関研究の結果を説明できなかった。著者は、強力な抗腫瘍性を有する海洋産マクロライドの作用機序の関わる研究を行い、この化合物が細胞骨格タンパク質のアクチンとチューブリンに同時に結合して、三元複合体を形成することを明らかにした。この結果、微小管ダイナミクスが阻害され、紡錘体に異常が起こり、アポトーシスが起こる。2大細胞骨格タンパク質と三元複合体を形成することを引き金とする抗腫瘍性メカニズムは初めての発見であり、今後の応用研究が期待される。これらの成果は、国際学術雑誌に掲載されており、天然物化学、ケミカルバイオロジー研究として高く評価されている。

### 〔最終試験結果〕

平成 26 年 2 月 17 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

### 〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。